Bull. Soc. Myc. Fr., t. 90, fasc. 4, 1974.

LES CHAMPIGNONS MICROSCOPIQUES LIÉS AUX AIGUILLES DE SAPIN (*ABIES ALBA* MILL.).

2. VARIATIONS SAISONNIÈRES DE LA MICROFLORE DES AIGUILLES TOMBANTES,

par F. GOURBIÈRE.

Résumé.

Les cultures obtenues à partir d'aiguilles tombées de Sapin (*Abies alba* Mill.) montrent que leur microflore fongique présente de très importantes variations saisonnières. L'activité pathogène de *Cytospora* entraîne sa dominance en hiver, *Aureobasidium pullulans* est présent sur les aiguilles tombées en été, alors qu'*Aureobasidium* sp 1 colonise presque toutes les aiguilles tombant en automne lors de la chute principale. L'écologie de ces deux dernières espèces est certainement différente.

⁂

La sénescence des feuilles est à l'origine d'un développement considérable de la microflore épiphylle (Dickinson, 1967) responsable des premières étapes de la décomposition de la litière, avant même son arrivée au sol. Les associations microfongiques participant à cette colonisation dite des « saprophytes primaires » ont été étudiées chez divers végétaux mais restent assez peu connues chez les conifères. Si divers auteurs se sont intéressés aux microflores intervenant dans la litière au sol, seul le travail de Kendrick et Burges (1962) a apporté quelques renseignements sur la colonisation des aiguilles lors de leur chute dans le cas du Pin sylvestre. Dans une étude préliminaire (Gourbière, 1974) nous avons décrit la microflore associée aux aiguilles de Sapin tombantes. La chute des aiguilles se répartissant sur toute l'année chez les conifères, il est probable que les phénomènes microbiologiques qui lui sont associés présentent des variations saisonnières. Ce problème n'ayant guère retenu l'attention jusqu'ici, nous avons entrepris son étude dans le cas du Sapin.

Matériel et méthodes.

Matériel.

Les aiguilles proviennent comme précédemment d'une sapinière du Mont Pilat (Tarentaise, Loire) dans le Massif Central, située à

Manuscrit présenté en séance du 10 juin 1974.

1100 m d'altitude. Elles y sont récoltées mensuellement dans des paniers grillagés placés à 50 cm du sol.

Ces aiguilles sont donc tombées depuis un mois au plus ; cependant deux remarques sont nécessaires à ce sujet :

— après leur abscission, les aiguilles peuvent être retenues quelques temps sur les branches inférieures avant d'atteindre le sol ;

— nous observons le résultat d'un développement de la microflore qui s'est déroulé dans une période précédente.

Il en résulte probablement un décalage de quelques (1-2) mois entre le maximum d'activité de la microflore et sa manifestation dans nos récoltes ; cette correction difficile à mesurer ne doit cependant pas être perdue de vue.

Méthodes.

Ayant constaté qu'une part non négligeable des chutes (environ de 10 à 40 %) était formée par des aiguilles encore vertes, nous les avons séparées des aiguilles brunes dans chaque récolte et étudiées séparément.

Chaque analyse porte sur un lot de 30 aiguilles qui sont traitées selon une technique proche de celle de Dickinson (1967). Les aiguilles sont soumises à 10 lavages successifs en tubes agités mécaniquement, destinés à éliminer les spores et autres propagules non fixées et considérées comme non actives à la surface de la feuille.

— lavage n° 1 : 5 minutes dans 20 ml d'eau distillée stérile ;

— lavages n° 2 et 3 : 5 minutes dans 20 ml d'eau distillée stérile additionnée de 2 gouttes de Tween 80 (mouillant non toxique) ;

— lavages n° 4 à 10 : 2 minutes dans 20 ml d'eau distillée stérile.

Séchées sur papier filtre stérile, les aiguilles sont ensuite déposées sur milieu nutritif gélosé (PDA : pomme de terre, dextrose, agar).

Après une incubation à 20°C ne dépassant pas une semaine, les colonies apparues sont prélevées et repiquées pour identification.

Calcul et expression des résultats.

Chaque relevé (Tab. I et II, Fig. 1) est résumé par les pourcentages d'aiguilles colonisées par chaque espèce, la somme de ces pourcentages correspond au nombre moyen d'espèces par aiguille (× 100) et peut être considéré comme un indice de l'intensité de la colonisation. Dans la Fig. 1. les résultats de la période octobre 1971-août 1972 ont été publiés précédemment (Gourbière, 1974).

Les nouveaux prélèvements (tabl. I et II) ont été faits aux dates suivantes :

8 : 15.11.1972	14 : 03.05.1973
9 : 03.12.1972	15 : 03.06.1973
10 : 03.01.1973	16 : 20.09.1973
12 : 13.03.1973	

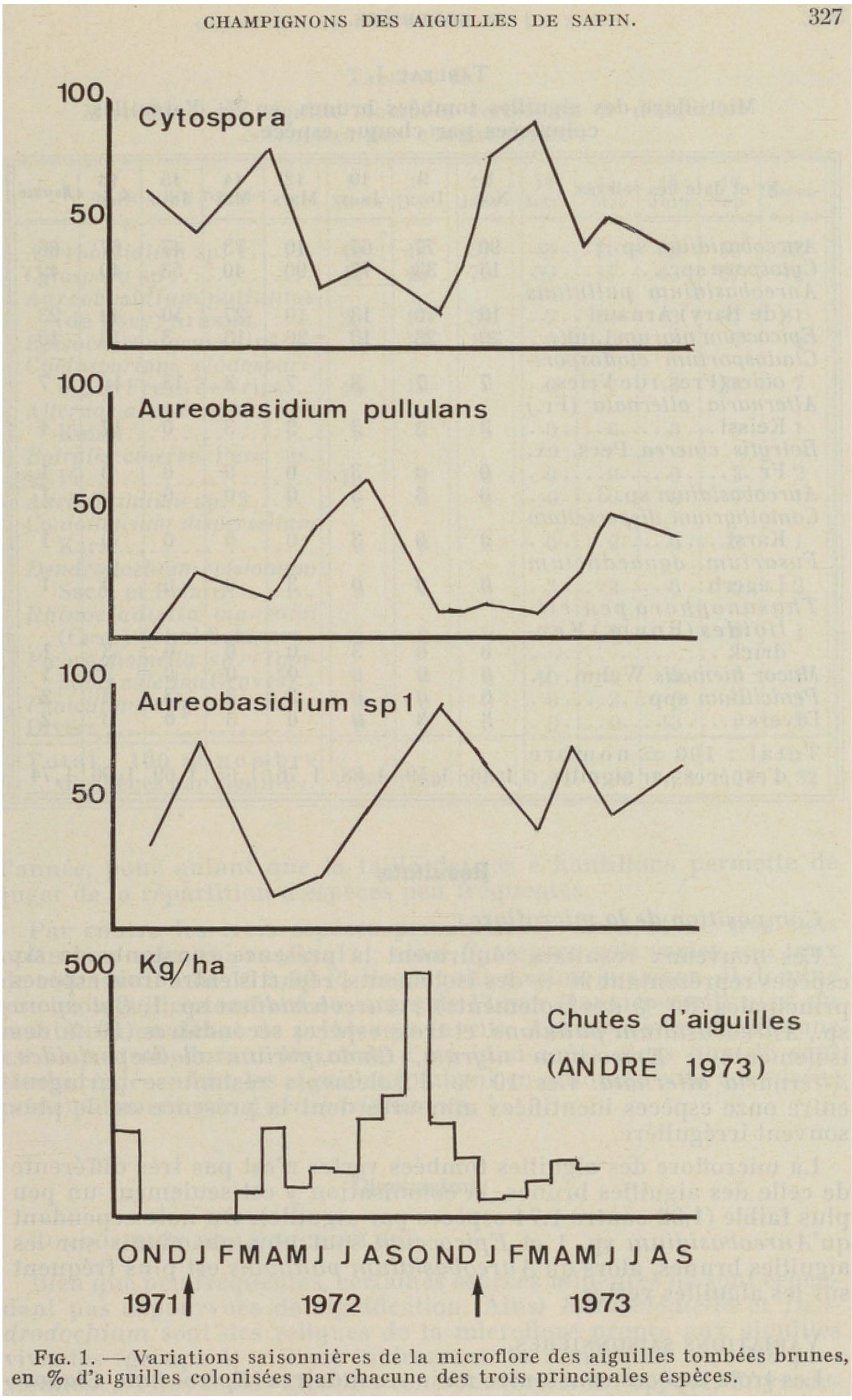

FIG. 1. — Variations saisonnières de la microflore des aiguilles tombées brunes, en % d'aiguilles colonisées par chacune des trois principales espèces.

TABLEAU I.

Microflore des aiguilles tombées brunes, en % d'aiguilles colonisées par chaque espèce.

N° et date des relevés	8 Nov.	9 Déc.	10 Janv.	12 Mars	14 Mai	15 Juin	16 Sep.	Moyenne
Aureobasidium sp. 1.....	90	77	67	40	73	47	67	66
Cytospora sp.....	13	33	77	90	40	53	40	49
Aureobasidium pullulans (de Bary) Arnaud	10	10	13	10	27	50	40	23
Epicoccum nigrum Link...	20	23	13	20	13	3	13	15
Cladosporium cladosporioides (Fres.) de Vries...	7	7	3	7	3	13	10	7
Alternaria alternata (Fr.) Keissl	3	3	3	3	3	0	17	4
Botrytis cinerea Pers. ex. Fr	0	0	3	0	0	0	0	1
Aureobasidium sp. 3.....	0	3	3	0	0	0	0	1
Coniothyrium dispersellum Karst.....	0	0	3	0	0	0	0	1
Fusarium aquaeductum Lagerh.....	0	0	0	3	0	0	0	1
Thysanophora penicillioides (Roum.) Kendrick	0	0	3	0	0	0	3	1
Mucor hiemalis Wehm....	0	0	0	0	0	0	3	1
Penicillium spp.....	0	0	0	3	3	3	3	2
Divers	3	3	0	0	3	0	0	2
Total : 100 = nombre d'espèces par aiguille..	1,46	1,59	1,88	1,76	1,65	1,69	1,96	1,74

Résultats.

Composition de la microflore.

Ces nouveaux résultats confirment la présence constante de six espèces représentant 90 % des isolements, répartis entre trois espèces principales (80 % des isolements) : *Aureobasidium* sp. 1, *Cytospora* sp., *Aureobasidium pullulans*, et trois espèces secondaires (10 % des isolements) : *Epicoccum nigrum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Alternaria alternata*. Les 10 % d'isolements restant se partagent entre onze espèces identifiées mineures dont la présence est le plus souvent irrégulière.

La microflore des aiguilles tombées vertes n'est pas très différente de celle des aiguilles brunes, la colonisation y est seulement un peu plus faible (1,32 contre 1,74 espèces par aiguille). On note cependant qu'*Aureobasidium* sp. 1 et *Epicoccum* sont plus abondants sur les aiguilles brunes, alors qu'*Aureobasidium pullulans* est plus fréquent sur les aiguilles vertes.

VARIATIONS SAISONNIÈRES.

Les trois espèces constantes mais secondaires (*Epicoccum*, *Cladosporium* et *Alternaria*) semblent réparties de façon quelconque toute

TABLEAU II.

Microflore des aiguille stombées vertes, en % d'aiguilles colonisées par chaque espèce.

N° et date des relevés	8 Nov.	9 Dec.	10 Janv.	12 Mars	14 Mai	15 Juin	16 Sep.	Moyenne
Aureobasidium sp. 1.....	40	43	37	10	20	23	53	32
Cytospora sp	43	43	70	57	17	43	37	44
Aureobasidium pullulans (de Bary) Arnaud.....	30	17	30	7	53	43	37	31
Epicoccum nigrum Link...	3	13	10	0	0	3	7	5
Cladosporium cladosporioides (Fres.) de Vries...	10	10	0	0	0	3	30	7
Alternaria alternata (Fr.) Keissl.....	0	3	3	0	0	0	0	1
Botrytis cinerea Pers. ex. Fr.....	10	0	0	0	0	0	3	2
Aureobasidium sp. 3.....	0	0	0	0	0	0	7	1
Coniothyrium dispersellum Karst.....	0	0	0	0	0	0	3	1
Dendrodochium epistomum Sacc. et Briard.....	0	7	0	3	3	0	0	2
Rhinocladiella mansonii (Cast.) Schol-Schwarz.	0	0	0	7	0	0	0	1
Pleurophomella sp. *(Tympanis abietina* Groves)..	0	0	0	10	0	0	0	1
Penicillium spp.....	0	0	3	0	3	0	0	1
Divers	0	3	3	0	0	13	0	3
Total : 100 = nombre d'espèces par aiguille..	1,36	1,39	1,56	0,94	0,96	1,28	1,77	1,32

l'année, pour autant que la taille de nos échantillons permette de juger de la répartition d'espèces peu fréquentes.

Par contre les trois espèces principales présentent de très nets optimums saisonniers (fig. 1) ; ainsi *Cytospora* voit varier son taux de colonisation de 10 à 90 % des aiguilles selon la saison. Il domine sur les aiguilles tombant au cours de l'hiver (janvier-avril) avec un maximum en début de printemps (avril). *Aureobasidium pullulans* est important durant les mois d'été (mai-août) alors que de septembre à décembre, les aiguilles tombant en automne sont colonisées principalement par *Aureobasidium* sp. 1.

Discussion.

COMPOSITION DE LA MICROFLORE.

Bien que peu fréquentes, certaines espèces mineures ne sont cependant pas dépourvues de signification. Ainsi *Rhinocladiella* et *Dendrodochium* sont des reliques de la microflore propre aux aiguilles vivantes (groupe I) ; il est intéressant de remarquer qu'elles proviennent ici des seules aiguilles tombées vertes. A l'opposé, *Thysanophora* et *Mucor* appartiennent à la microflore de la litière (GOUR-

BIÈRE, 1974) ; ils marquent, sur les aiguilles brunes seulement, les premiers indices des stades ultérieurs de la colonisation.

La faible présence de ces espèces montre bien l'originalité de la microflore des aiguilles tombantes par rapport à celle des aiguilles vivantes et à celle de la litière. Mais elle montre aussi le caractère transitoire de ces espèces dont la période d'activité se réduirait à quelques mois selon KENDRICK et BURGES (1962) dans le cas des aiguilles de Pin.

La microflore des aiguilles mortes provient cependant en partie de celle des aiguilles vivantes où des espèces comme *Aureobasidium* sp. 1 et *Cladosporium* (groupe II) sont déjà présentes. Par contre *Cytospora, Epicoccum, Alternaria* et *Aureobasidium pullulans* (groupe III) ne se développent abondamment que lors de la chute des aiguilles. Le cas d'*Aureobasidium pullulans* devra être réexaminé car son absence relative sur les aiguilles vivantes est peut être dû à un développement levuriforme entraînant son élimination lors du lavage des aiguilles. On comprendrait mieux alors sa présence préférentielle sur les aiguilles tombées vertes.

Epicoccum, Alternaria et *Cladosporium* sont des saprophytes primaires ubiquistes (HUDSON, 1971), il est à noter qu'ils ne jouent ici qu'un rôle secondaire, ce qui invite à nuancer le caractère banal parfois attribué à cette microflore des saprophytes primaires colonisant les débris végétaux. Dans le cas des aiguilles de Sapin, les trois principales espèces ne peuvent être rangées dans ce groupe.

ECOLOGIE DE *Cytospora*.

Les aptitudes phytopathogènes de ce genre sont connues, aussi bien chez les feuillus que chez les conifères (SMERLIS, 1971) où plusieurs espèces peuvent affecter *Abies alba* (ALLESCHER, 1901). Elles se manifestent dans les sapinières du Mont Pilat par une infection des extrémités de branches dont les aiguilles brunissent en automne, puis se déssèchent en hiver et portent dès le mois de décembre des pycnides à maturité qui semblent appartenir à *Cytospora friessi* Sacc. Ces rameaux tombent pour la plupart au sol au début du printemps ; cependant quelques uns restent sur l'arbre où ils se défeuillent progressivement. Les isolements obtenus à partir des pycnides sont identiques à ceux obtenus des aiguilles tombées en général.

Il semblerait donc possible de relier le maximum d'isolement de *Cytospora*, son activité pathogène et la chute secondaire d'aiguilles en fin d'hiver, mais certaines observations nous invitent à nuancer cette hypothèse :

— toutes les aiguilles tombant à cette époque ne portent pas les pycnides qui abondent sur celles des rameaux infectés ;

— les aiguilles tombées vertes ne proviennent pas des rameaux infectés qui sont tous désséchés ; pourtant leur microflore est aussi riche en *Cytospora* ;

— les aiguilles des rameaux infectés ne livrent que *Cytospora* en culture, alors que celles recueillies dans les paniers ont une microflore plus variée.

Le développement de *Cytospora* à cette époque de l'année nous parait donc relever de deux processus :

— l'un pathologique, correspondant à une colonisation interne excluant les autres espèces fongiques,

— l'autre saprophyte ; les spores libérées par les pycnides des aiguilles infectées se développant à la surface d'aiguilles non infectées mais sénescentes, en même temps que d'autres champignons.

La faible présence de *Cytospora* en été correspondrait à la chute des dernières aiguilles infectées persistant sur l'arbre, alors que l'activité saprophyte ne se maintiendrait pas en l'absence de nouvelles contaminations.

L'intervention d'espèces pathogènes dans la microflore des feuilles sénescentes est fréquement signalée, ainsi *Ascochyta pinodes* sur les feuilles de *Pisum* (Dickinson, 1967). Il s'agit souvent d'espèces maculicoles qui transitent normalement par la surface de la feuille avant de pénétrer à l'intérieur. Dans le cas de *Cytospora*, le déssèchement de rameaux entiers montre que le parasite est vasculaire, ne se développant pas à la surface des aiguilles, sauf lors de la phase saprophyte associée.

Dickinson (1967) considère qu'*Ascochyta* représente le saprophyte primaire spécifique de la phyllosphère du Pois, tout en n'excluant pas une origine parasitaire. Chez *Pinus sylvestris* (Kendrick et Burges, 1962) ce rôle revient à *Fusicoccum bacillare*, espèce non pathogène, déjà présente sur les aiguilles vivantes alors que *Cytospora* y reste rare. Ces auteurs notent cependant que *Fusicoccum* colonise l'intérieur des aiguilles, ce qui rapproche son activité de celle de *Cytospora*.

En conclusion, si *Cytospora* est bien une espèce spécifique du Sapin, il parait difficile d'en faire un saprophyte primaire, car son activité est trop liée à son développement pathogène saisonnier. Celui ci, bien séparée dans le temps de la sénescence, permet d'analyser l'influence d'une maladie cryptogamique chronique sur la microflore épiphylle.

Ecologie d'*Aureobasidium pullulans* et d'*Aureobasidium* sp 1.

Le cas de ces deux espèces est plus complexe, à cause de la confusion taxinomique qui règne au sujet de ce genre et qui est en partie responsable de sa réputation ubiquiste. Un certain nombre de travaux montrent en effet que l'on confond sous ce nom des stades *Aureobasidium* d'espèces bien différentes, et à habitats bien spécifiques.

Notre *Aureobasidium pullulans* semble être la forme *Aureobasidium* de *Dothichiza pithyophila* (Cda) Petr., saprophyte fréquent des conifères et limité à ces végétaux (Gremmen, 1960). Cette identification, déjà proposée par Robak (1952), reprise par Butin (1963) et par Cooke (1959, 1962), a été vérifiée pour de nombreuses souches d'*A. pullulans* isolées de conifères. Sur les aiguilles mortes de *Pinus sylvestris*, Kendrick et Burges (1962) observent simultanément la présence des pycnides de *Sclerophoma* (= *Dothichiza*) *pithyophila* et l'isolement en culture de *Pullularia* (= *Aureobasidium*) *pullulans*.

Aureobasidium sp. 1, par contre, ne ressemble ni à l'espèce précédente, ni à l'*Aureobasidium pullulans* classique. HUDSON (1966) a déjà rencontré sur des aiguilles de conifères (*Pinus silvestris*) la coexistence de deux *Aureobasidium*, l'un qu'il rapporte à *Dothichiza pithyophila*, l'autre qu'il considère comme un stade de *Guignardi fagi*, lien démontré par cet auteur pour des souches identiques isolées de feuillus.

Sans préjuger des résultats de l'étude d'*A.* sp. 1, les deux *Aureobasidium* présents sur les aiguilles tombantes de Sapin ne peuvent être considérés comme des ubiquistes au même titre qu'*Epicoccum* ou *Cladosporium*. En reprenant une distinction de HUDSON (1968), ce seraient des saprophytes restreints (à un type d'hôtes) alors que *Cytospora* serait un « saprophyte » spécifique.

Ces deux espèces d'*Aureobasidium* sont nettement liées à la chute principale d'aiguilles en automne, donc à la sénescence ; cependant, seul *Aureobasidium* sp. 1 présente une évolution exactement parallèle à la chute d'aiguilles. Sa présence sur les aiguilles vivantes (groupe II) et son accroissement avec l'âge (GOURBIÈRE, résultats inédits) en font le type même des saprophytes primaires rencontrés sur de nombreux types de feuilles (groupe I de HOGG et HUDSON (1966) chez *Fagus sylvatica*, groupe A de PUGH et MULDER (1971) sur *Typha latifolia*).

Aureobasidium pullulans présente un maximum franchement estival, correspondant aux premières fractions de la chute principale d'aiguilles, mais régresse très vite lors du maximum proprement dit. COOKE (1959) cite divers cas où *A. pullulans*, associé à des blessures (insectes), provoque la chute des aiguilles de conifères : il serait alors possible que notre maximum estival soit lié à la reprise de l'activité des insectes au printemps et à la chute précoce des aiguilles blessées. Ceci pourra être vérifié en liaison avec la répartition de cette espèce sur les aiguilles vivantes, où, s'il est très rare sur les aiguilles âgées (voir réserves ci dessus), il est un peu plus fréquent sur les aiguilles jeunes, situation inverse de celle observée pour *Aureobasidium* sp. 1. Nous avons déjà noté qu'*A. pullulans* était plus abondant sur les aiguilles tombées vertes que sur les aiguilles brunes. Ces particularités laissent supposer qu'*A. pullulans* colonise des aiguilles dont la chute n'est pas due à la sénescence mais à des causes accidentelles dont la nature reste à démontrer.

Conclusions.

Chacune des trois principales espèces microfongiques colonisant les aiguilles de Sapin lors de leur chute possède une écologie différente, correspondant à un optimum saisonnier bien distinct :

— *Cytospora*, parasite hivernal ;

— *Aureobasidium* sp. 1, saprophyte lié à la sénescence en automne ;

— *Aureobasidium pullulans*, estival, est peut être un parasite de blessure.

Nous remercions le Centraalbureau Voor Schimmelcultures (Baarn) pour l'identification de certaines espèces et M. MORELET (Laboratoire de Pathologie forestière, Nancy) qui a bien voulu examiner nos échantillons de *Cytospora*.

Bibliographie.

Allescher A. (1901). — « *Fungi imperfecti* », *In* « Rabenhorst's Kryptogamen-Flora », 1 (6), E. Kummer, Leipzig.

André J. (1973). — Contribution à l'étude écologique d'une sapinière du Massif du Pilat : Apport au sol d'éléments minéraux et de matière organique, avec analyse particulière de composés polyphénoliques. *Thèse 3e cycle,* Lyon, 119 p.

Butin H. (1964). — Ueber zwei Nebenfruchtformen von *Sydowia polyspora* (Bref. et v. Tav.) Müller. *Sydowia,* 17, 114-118.

Cooke W. B. (1959). — An ecological life history of *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud. *Mycopath. Mycol. appl.,* 12, 1-45.

Coooke W. B. (1962). — A taxonomic study in the « black yeasts ». Mycopath. *Mycol. appl.,* 17, 1-42.

Dickinson C. H. (1967). — Fungal colonisation of *Pisum* leaves. *Can. J. Bot.,* 45, 915-927.

Gourbière F. — Les champignons microscopiques liés aux aiguilles de sapin (*Abies alba* Mill.). 1 — Premiers résultats. *Bull. Soc. Myc. Fr.* (à paraître).

Gremmen J. (1960). — A contribution to the mycoflora of the pine forests of the Netherlands. *Nova Hedwigia,* 1, 251-288.

Hogg B. M. and H. J. Hudsoon (1966). — Microfungi on the leaves of *Fagus sylvatica.* 1. The micro-fungal succession. *Trans. Br. mycol. Soc.,* 49, 185-192.

Hudson H. J. (1966). — An ascomycete with *Aureobasidium pullulans* type conidia. *Nova Hedwigia,* 10, 319-328.

Hudson H. J. (1968). — The ecology of fungi on plant remains above the soil. *New Phytol.,* 67, 837-874.

Hudson H. J. (1971). — The development of the saprophytic flora as leaves senesce and fall. *In « Ecology of leaf surface micro-organisms »*. (T. F. Preece and C. H. Dickson Ed.), 447-455, Academic Press, New-York.

Kendrick W. B. and A. Burges (1962). — Biological aspect of the decay of *Pinus sylvestris* leaf litter. *Nova Hedwigia,* 4, 313-342.

Pugh G. J. F. and J. L. Mulder (1971). — Mycoflora associated with *Typha latifolia. Trans. Br. mycol. Soc.,* 57, 273-282.

Robak H. (1952). — *Dothichiza pithyophila* (Cda) Petr. the pycnidial stage of a mycelium of the type *Pullularia pullulans* (de B.) Berkkout. *Sydowia,* 6, 361-362.

Smerlis E. (1971). — Pathogenicity tests of *Valsa* species occuring on conifers in Quebec. *Phytoprotection,* 52, 28-31.

(Université Claude Bernard, Laboratoire d'Ecologie Bât. 741,
Département de Biologie Végétale,
43, Boulevard du 11 novembre 1918, 69621 - Villeurbanne).